

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Sintesis dan Laboratorium Kimia Terpadu II Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2018.

4.3 Bahan Penelitian

4.3.1 Bahan Ekstrak

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak cair *strawberry* (*Fragaria x ananassa*) di pasaran. Yang dibeli di :

- PT. A
- PT. B
- PT. C

4.3.2 Penapisan Fitokimia

4.3.2.1 Bahan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

N-Heksan, etanol, HCl pekat, serbuk magnesium, dan butanol.

4.3.2.2 Bahan Identifikasi Senyawa Golongan Polifenol dan Tanin

FeCl₃, NaCl 10% dalam aquadest, larutan gelatin, aquadest panas.

4.3.3 Analisis Antioksidan

DPPH (2,2 *Diphenyl-1-picrylhydrazyl*), Metanol p.a, Vitamin C Pharmaceutical Grade, Aluminium Foil.

4.4 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penapisan fitokimia antara lain pipet kaca, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass 50ml, corong kaca, kertas saring, water bath, penjepit kayu, aluminium foil, dan batang pengaduk.

Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan meliputi neraca analitik, spatula, gelas beaker 50 ml, gelas beaker 100 ml, pipet volume, kuvet, pipet tetes, spektrofotometer UV-Vis, labu ukur 10,0 ml dan 50,0 ml Pyrex, botol gelap.

4.5 Rancangan Penelitian

4.5.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak cair *strawberry* dengan metode DPPH.

4.5.2 Variabel Penelitian

➤ Variabel Bebas

Sebagai variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak cair *strawberry* dengan menggunakan konsentrasi 100, 150, 200, 250 dan 300 ppm.

➤ Variabel Tergantung

Sebagai variabel tergantung pada penelitian ini adalah absorbansi yang terukur terhadap hasil reaksi antara ekstrak cair *strawberry* dengan larutan DPPH pada berbagai konsentrasi ekstrak.

4.6 Penapisan Fitokimia

4.6.1 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

a) Preparasi Sampel

- 0,3 gram ekstrak ditambah 3 ml n-heksana dikocok berulang kali dalam tabung reaksi hingga ekstrak n-heksana tidak berwarna
- Residu ditambah 20 ml etanol dan dibagi jadi 4 bagian, setiap tabung diberi nama sebagai larutan IA, IB, IC, dan ID.

b) Reaksi Warna

- Uji Bate-Smith dan Metcalf
 - 1) Tabung IA sebagai blanko, tabung IB ditambah HCl pekat 0,5 ml dan diamati setiap perubahan warna, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi.
 - 2) Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya senyawa leucoantosianin.
- Uji Wilstater
 - 1) Tabung IA sebagai blanko, tabung IC ditambah HCl pekat 0,5 ml dan sedikit magnesium.
 - 2) Diamati perubahan warnanya, lakukan pengenceran dengan 2 ml air suling dan 1 ml butanol.

- 3) Diamati warna pada setiap lapisan. Warna jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan adanya flavonol, merah tua menunjukkan adanya flavanon.

4.6.2 Identifikasi Senyawa Golongan Polifenol dan Tanin

a) Preparasi Sampel

- 0,3 gram ekstrak ditambah 10ml aquadest panas, diaduk dan dibiarkan sampai temperature kamar, lalu tambahkan 3-4 tetes 10% NaCl, diaduk dan disaring.
- Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing disebut sebagai larutan IA, IB, dan IC.

b) Uji Gelatin

- Larutan IA digunakan sebagai blanko, larutan IB ditambah dengan sedikit larutan gelatin dan 5ml larutan NaCl 10%.
- Jika terjadi endapan putih menunjukkan adanya tanin.

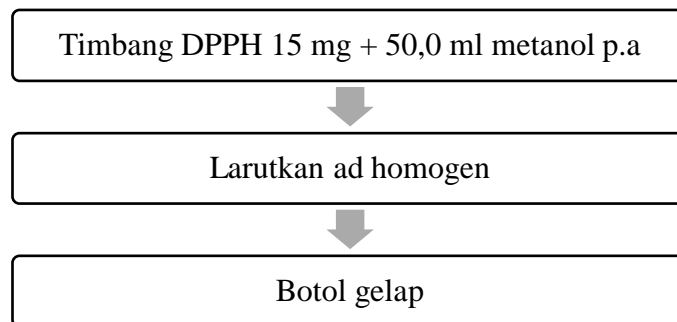
c) Uji Ferri Klorida

- Sebagai larutan IC diberi beberapa tetes larutan FeCl_3 , kemudian diamati terjadinya perubahan warna.
- Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin.
- Jika :
 FeCl_3 positif, uji gelatin positif : tanin (+)
 FeCl_3 positif, uji gelatin negatif : polifenol (+)
 FeCl_3 negatif : polifenol (-), tanin (-)

4.7 Evaluasi Uji Antioksidan

4.7.1 Pembuatan Larutan

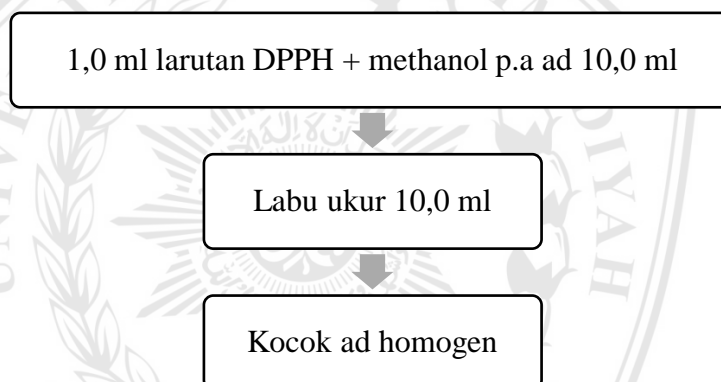
Ditimbang sebanyak 15 mg DPPH (BM : 394,32). Dilarutkan dengan metanol p.a ad 50,0 ml kemudian ditempatkan pada botol gelap, diperoleh konsentrasi 300 ppm. Cara pembuatan larutan DPPH : (Syukur *et al.*, 2011).



Gambar 4. 1 Bagan Alur Kerja Pembuatan Larutan DPPH

4.7.2 Pembuatan Larutan Blanko

Dipipet 1,0 mL larutan DPPH dimasukkan kedalam labu ukur 10,0 ml, di tambahkan methanol p.a ad 10,0 ml, kemudian di kocok ad homogen. Cara pembuatan blanko dapat dilihat pada gambar



Gambar 4. 2 Bagan Alur Kerja Pembuatan Larutan Blanko

4.7.3 Pembuatan Larutan Uji

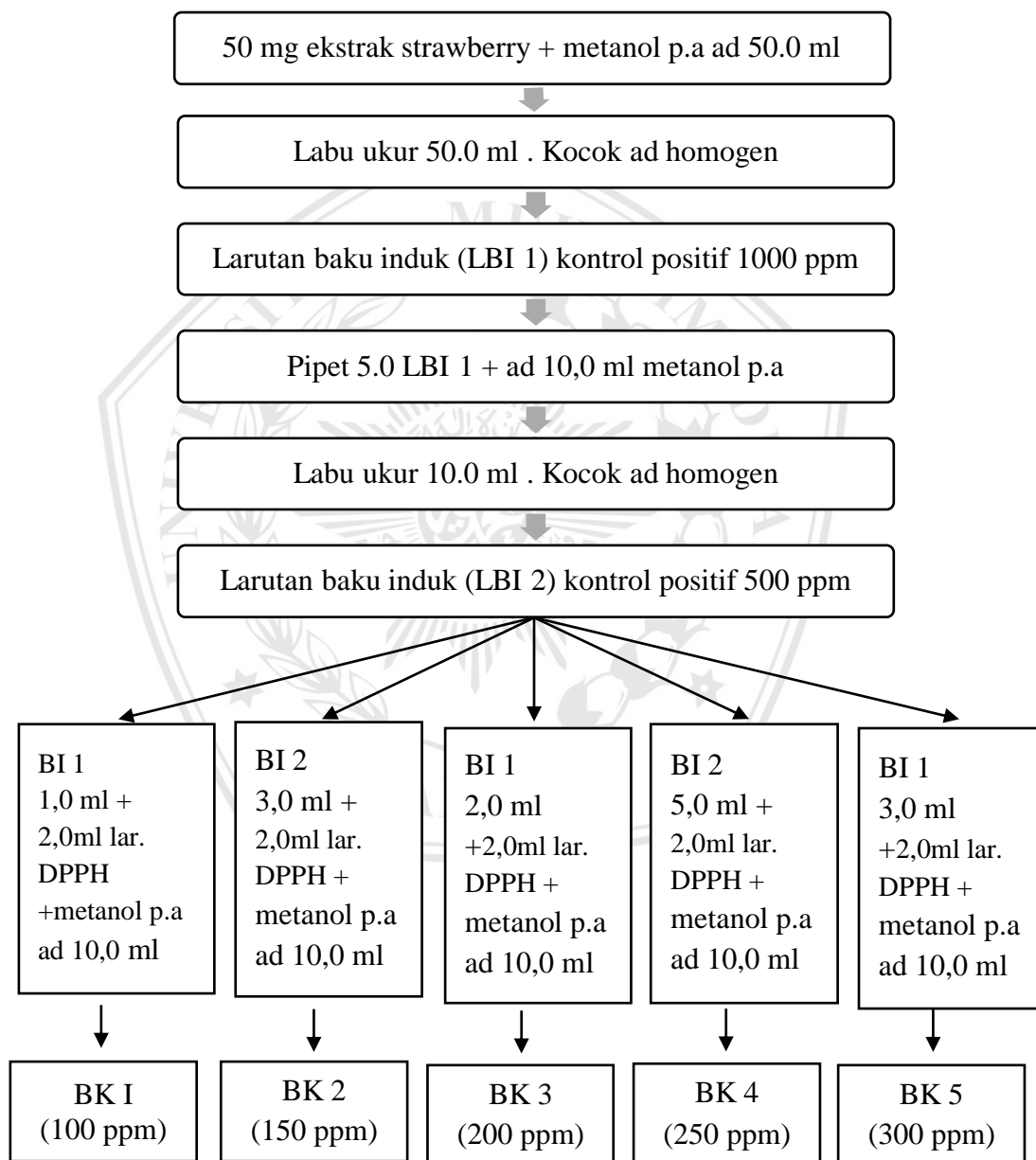
1. Pembuatan Baku Induk (BI)

- 1) BI 1 : timbang ekstrak 50 mg + ad 50,0 ml metanol p.a = 1000 ppm
- 2) BI 2 : pipet BI 1 5,0 ml + ad 10,0 ml metanol p.a = 500 ppm

2. Pembuatan Baku Kerja

Pembuatan larutan baku kerja adalah sebagai berikut :

- 1) BK 1 : pipet 1,0 ml BI 1 + ad 10,0 ml metanol p.a = 100 ppm
- 2) BK 2 : pipet 3,0 ml BI 2 + ad 10,0 ml metanol p.a = 150 ppm
- 3) BK 3 : pipet 2,0 ml BI 1 + ad 10,0 ml metanol p.a = 200 ppm
- 4) BK 4 : pipet 5,0 ml BI 2 + ad 10,0 ml metanol p.a = 250 ppm
- 5) BK 5 : pipet 3,0 ml BI 1 + ad 10,0 ml metanol p.a = 300 ppm



Gambar 4. 3 Bagan Alur Kerja Pembuatan Larutan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Cair *Strawberry*

4.7.4 Pembuatan Larutan Kontrol Positif (Vitamin C)

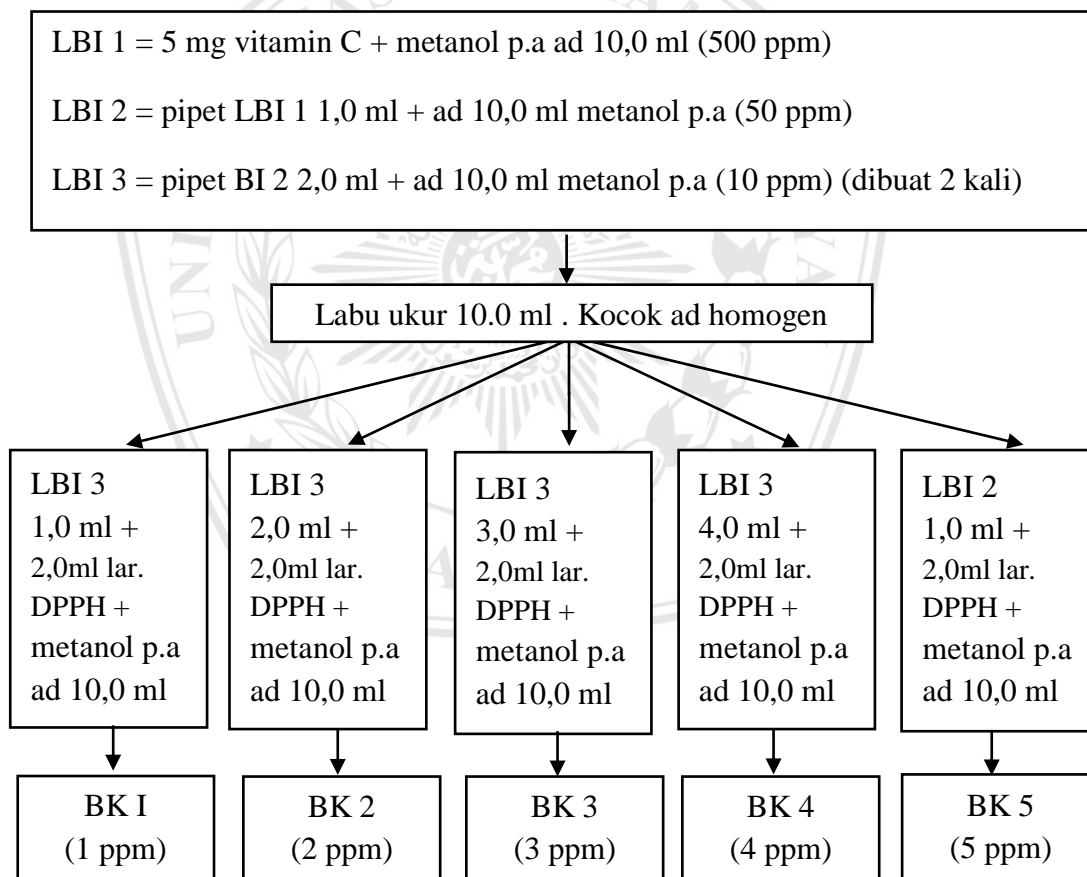
a) Pembuatan Baku Induk (BI)

- 1) BI 1 : timbang Vit.C 5 mg + ad 10,0 ml metanol p.a = 500 ppm
- 2) BI 2 : pipet BI 1 1,0 ml + ad 10,0 ml metanol p.a= 50 ppm
- 3) BI 3 : pipet BI 2 2,0 ml + ad 10,0 ml metanol p.a= 10 ppm (buat 2 kali)

b) Pembuatan Baku Kerja

Pembuatan larutan baku kerja adalah sebagai berikut :

- 1) BK 1 : pipet 1,0 ml BI 3 + ad 10,0 ml metanol p.a = 1 ppm
- 2) BK 2 : pipet 2,0 ml BI 3 + ad 10,0 ml metanol p.a = 2 ppm
- 3) BK 3 : pipet 3,0 ml BI 3 + ad 10,0 ml metanol p.a = 3 ppm
- 4) BK 4 : pipet 4,0 ml BI 3 + ad 10,0 ml metanol p.a = 4 ppm
- 5) BK 5 : pipet 1,0 ml BI 2 + ad 10,0 ml metanol p.a = 5 ppm



Gambar 4. 4 Bagan Alur Kerja Pembuatan Larutan Kontrol Positif (Vitamin C)

4.7.5 Proses Inkubasi

Setelah selesai membuat blanko, larutan baku kerja ekstrak cair *strawberry*, dan larutan baku kerja vitamin C. Semua larutan diinkubasikan pada temperatur 37° dalam waktu 30 menit.

4.7.6 Pengukuran Absorbansi

Setelah didapatkan waktu inkubasi kemudian larutan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang yang didapatkan dari lamda maksimum DPPH. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dalam larutan berair atau larutan methanol serta memiliki serapan kuat dalam bentuk teroksidasi pada panjang gelombang 515nm (Purwaningsih, 2012).

4.8 Analisis Data

4.8.1 Data Absorbansi

Data-data yang diperoleh akan dianalisis secara deskriptif. Analisis secara deskriptif akan diketahui nilai IC₅₀ dari larutan uji ekstrak cair *strawberry* dan kontrol positif.

4.8.2 Perhitungan Inhibisi

Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100 \%$$

Keterangan :

A blanko = serapan radikal DPPH

A Sampel = serapan radikal DPPH setelah diberi perlakuan sampel

4.8.3 Perhitungan IC₅₀

Inhibitor Concentration 50% untuk menyatakan aktifitas antioksidan. IC₅₀ ialah konsentrasi ekstrak cair *strawberry* yang mampu meredam DPPH sebanyak 50% (Edawati, 2012). Untuk dapat menentukan konsentrasi ekstrak yang dapat meredam 50% DPPH maka digunakan persamaan regresi linier dari rentang konsentrasi ekstrak dengan % perendaman DPPH. Nilai 50% didapatkan dari nilai

x setelah mengganti $y=50$. Dari persamaan $y=a+bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Perbandingan hasil nilai IC_{50} ekstrak cair *strawberry* dan vitamin C dihitung untuk mengetahui efek antioksidan pada sampel ekstrak cair *strawberry*.

